Abdruck

aus dem

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde.

Originale

In Verbindung mit

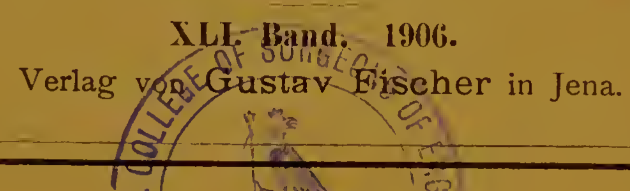
Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun
Greifswald Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3.

XLI. Band. 1906.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.



Abdruck aus dem
Centralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten.
I. Abteilung. Originale.
Herausgeg. von Prof. Dr. **O. Uhlworm** in **Berlin.** — Verlag von **Gust. Fischer** in **Jena.**
XLI. Bd. 1906. Heft 2.

Ueber die Eigenschaften eines von Ziegen gewonnenen Antityphusserums.

Von **Allan Macfadyen,**
Lister Institute of Preventive Medicine London.

In dieser Mitteilung habe ich die Absicht, einen kurzen Bericht über die Resultate zu geben, welche ich durch Immunisierung der Ziege mit den Zellsäften der Typhusbacillen erhalten habe. Die Experimente sind eine Fortsetzung der früher veröffentlichten, deren Hauptziel es war, einen Antikörper gegen das Typhusendotoxin zu gewinnen (1). Bei anderer Gelegenheit werde ich über die Versuche berichten, welche mich zu der jetzt beschriebenen Immunisierungsmethode geführt haben und auch über die soweit überstandenen Schwierigkeiten, welche den Fortschritt meiner Untersuchungen verzögert haben.

Es wird augenblicklich genügend sein, wenn ich sage, daß zur Lösung der theoretischen und praktischen Fragen, die mir entgegengetreten sind, die Ziege sich als ein viel geeigneteres Tier als das Pferd erwiesen hat. Es war viel leichter, die Methode, die ich später auf das Pferd übertragen will, zuerst an der Ziege gründlich auszuarbeiten. Die Versuche sind jetzt so weit vorgeschritten, um einen Bericht darüber geben zu können. Der Zweck der Versuche war also folgender:

Wie kann man am besten durch Benutzung der Zellsäfte des Typhusbacillus einen Antikörper für das schon demonstrierte Typhusendotoxin erzeugen, und eine befriedigende Steigerung des antitoxischen Wertes des Serum erreichen.

Im Laufe meiner Versuche sind von Dr. Besredka zwei Arbeiten erschienen über einen Antikörper für das Typhusendotoxin (2). Diese werde ich zuerst kurz erwähnen.

Besredka hat nämlich ein Pferd mit toten und lebenden Typhusbacillen intravenös injiziert. Die am Pferde gemachten Injektionen erstreckten sich über 2 Jahre. — Das Pferdeserum wurde auf seinen antitoxischen Wert geprüft gegen 1) getötete und getrocknete Typhuskulturen, wovon 0,01 g Merrschweinchen intraperitoneal tötete, 2) ein lösliches Endotoxin von den trockenen Bacillen extrahiert, wovon $^1/_8$ ccm tödlich war. Die Hauptresultate waren folgende: 10 cg trockenes Serum (ungefähr 1 ccm) neutralisierte 10 Dosen der toten Bacillen und 16 Dosen des löslichen Endotoxins auf Meerschweinchen geprüft.

Diesen niedrigen Wert hat Besredka nach 2 Jahre langer Behandlung des Pferdes mit Typhuskulturen erhalten. Ich werde nochmals auf seine Resultate zurückkommen.

Die Zellsäfte, die ich für meine Versuche benutzt habe, wurden in folgender Weise präpariert. Die virulenten Typhusbacillen direkt von der Bauchhöhle des Meerschweinchens isoliert, wurden auf Nähragar in Roux-Flaschen 18 Stunden lang bei Bruttemperatur gezüchtet. Die Kulturen wurden mit destilliertem Wasser abgewaschen, und $^1/_2$ Stunde lang zentrifugiert. Die Bacillen wurden danach bei der Temperatur von flüssiger Luft in dem schon beschriebenen Apparat zerkleinert, ungefähr $^1/_2$ Stunde pro Gramm Bacillen. Das Produkt wurde in 1 pro Mille Kalilaugelösung aufgenommen und während 2 Stunden zentrifugiert. In dieser Weise bekam man einen 10-proz. Extrakt von Typhuszellsaft

und als Beimengung solche Bacillen, die nicht durch das 2 Stunden lange Zentrifugieren entfernt wurden. Die Flüssigkeit wurde $^1/_2$ Stunde mit Chloroformdampf behandelt. Die so erhaltenen Zellsäfte waren steril und für die Versuchstiere, nämlich Ziegen und Kaninchen, akut toxisch intravenös.

Die nach dieser Methode gewonnenen Endotoxine sind labile Körper und die Zellsäfte verlieren rasch ihre ursprüngliche Giftigkeit. Die aufbewahrten Zellsäfte haben geringe oder gar keine toxische Wirkung.

Die Versuche, welche ich mit diesen Säften zuerst gemacht habe, überzeugten mich, daß man in dieser Weise wenig Toleranz in den Versuchstieren gegen vollgiftige Säfte erzeugen würde. Die Wahrscheinlichkeiten waren gegen diese leichtere und weniger gefährliche Immunisierungsmethode.

Ich habe deshalb in meinen späteren Versuchen nur frische, akuttoxische Zellsäfte benutzt. Die Säfte enthielten durchschnittlich 10 bis 12 mg feste Bestandteile pro Kubikcentimeter.

Die frischen Säfte wirkten auf Ziegen intravenös akut toxisch. Die erste Ziege starb nach Einspritzung von 1 ccm; $^1/_{10}$ ccm war auch akut toxisch und 2 Ziegen starben nach Einspritzung von $^1/_{20}$ ccm binnen 12 Stunden. Die Tiere wurden ohnmächtig mit heftiger Diarrhöe. Andere Ziegen bekamen nach Injektion von $^1/_{20}$ ccm akut Diarrhöe, und $^1/_{30}$ ccm genügte schon, die Tiere krank zu machen.

Es war deshalb klar, daß die intravenösen Injektionen der toxischen Zellsäfte sehr vorsichtig ausgeführt sein mußten, um die Tiere nicht zu sehr anzugreifen oder zu töten. Eine Ziege starb nach Einspritzung von $^1/_{20}$ und $^1/_{10}$ ccm; eine andere Ziege nach Injektion von $^1/_{20}$, $^1/_{10}$, $^1/_2$ und 1 ccm binnen 4 Stunden. Diese Erfahrungen haben mich gelehrt, mit kleineren Dosen anzufangen und sie sehr allmählich nach genügenden Intervallen zu steigern — eine Injektion wöchentlich war genügend.

Es war auch zweckmäßig, dieselbe Dosis zu wiederholen, bis sie nicht mehr toxisch wirkte, ehe man sie steigerte. Die Methode hat sich bis jetzt bewährt, denn nur durch sie ist es gelungen, die Tiere an sonst tödliche Dosen des Endotoxins gewöhnen zu können.

In dem hier beschriebenen Versuche wurde die antiendotoxische Wirkung des Serums auf Kaninchen probiert. Das Endotoxin tötete Kaninchen intravenös in akuter Weise, z. B. $^1/_{10}$ ccm nach heftiger Diarrhöe, manchmal in 2 Stunden; auch $^1/_{20}$ ccm war ebenfalls eine tötliche Dosis. Nach Einspritzung waren die Kaninchen gewöhnlich binnen einer Stunde krank. Die Bedingungen waren deshalb genügend streng, um irgend eine antiendotoxische Wirkung zu konstatieren. Die Toxicität der Zellsäfte war bei jedem Versuch festgestellt.

Ich habe mich zuerst überzeugt, daß weder normales Ziegen- oder Kaninchenserum irgend eine bemerkbare antitoxische Wirkung besaß. Das Serum der behandelten Ziegen wurde auch für Agglutinine und und Bakteriolysine geprüft.

Ich werde nun meinen ersten gelungenen Versuch mitteilen.

Ziege I.

Bekam intravenös jeden 7. Tag folgende Mengen der toxischen Zellsäfte des B. typhosus:

$^1/_{20}$ ccm: Tier krank, $^1/_{10}$ ccm: krank, $^1/_5$ ccm: krank, $^1/_2$ ccm: krank, 1 ccm: krank, 1 ccm: krank, 1 ccm: wohl, 1,5 ccm: wohl, 1,5 ccm: wohl, 2 ccm: krank, 2 ccm: krank, 2,5 ccm: Tier tot.

Nach diesem Versuch war es klar, daß andere Tiere noch vorsichtiger und mit noch geringeren Dosen behandelt werden mußten.

Die Serumprüfungen der Ziege I sind in Tabelle II gegeben. In allen Proben wurde das Gemisch von Serum und Gift vor Einspritzung $^1/_2$ Stunde bei 37° C gehalten.

I.
Normalserum der Ziege.

Kaninchen I:	3 ccm Serum +	1 ccm Endotoxin	†
„ II:	2 „ „ +	1 „ „	†
„ III:	Kontrolle	$^1/_{10}$ „ „	†
„ IV:	„	$^1/_{20}$ „ „	Diarrhöe.

3 ccm des normalen Ziegenserums hat also 1 ccm eines toxischen Zellsaftes nicht neutralisiert, wovon $^1/_{10}$ ccm tödlich war und $^1/_{20}$ ccm toxisch wirkte.

II.
Serumprüfung der Ziege I.

Datum	Kaninchen	Serum + Endotoxin	Bemerkungen
23. Juni 1905	1	3 ccm Serum + 1 ccm Endotoxin	lebt
	2	Kontrolle 1 „ „	tot
7. Juli 1905	1	3 ccm Serum + 2 „ „	lebt
	2	3 „ „ + 1 „ „	„
	3	2 „ „ + 1 „ „	„
	4	Kontrolle 2 „ „	tot nach 4 Std.
	5	„ $^1/_{20}$ „ „	„ „ 18 „
14. Juli 1905	1	3 ccm Serum + 2 „ „	lebt
	2	2 „ „ + 2 „ „	„
	3	1 „ „ + 1 „ „	„
	4	$^1/_{10}$ „ „ + 1 „ „	„
	5	Kontrolle $^1/_{10}$ „ „	tot
	6	„ $^1/_{20}$ „ „	akut Diarrhöe
21. Juli 1905	1	1 ccm Serum + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_2$ „ „ + 1 „ „	„
	3	$^1/_{10}$ „ „ + 1 „ „	„
	4	Kontrolle 1 „ „	tot
	5	„ $^1/_{10}$ „ „	akut Diarrhöe
	6	„ $^1/_{15}$ „ „	„ „
4. Aug. 1905	1	$^1/_{20}$ ccm Serum + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_{50}$ „ „ + 1 „ „	„
	3	$^1/_{100}$ „ „ + 1 „ „	„ tödliche Dosis nicht vermittelt
11. Aug. 1905	1	$^1/_{20}$ „ „ + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_{50}$ „ „ + 1 „ „	„
	3	$^1/_{100}$ „ „ + 1 „ „	tot
	4	Kontrolle 1 „ „	„ nach 4 Std.
	5	„ $^3/_{10}$ „ „	„ „ 18 „
	6	„ $^1/_{10}$ „ „	„ „ 18 „

Die Tabelle zeigt, daß im Laufe der Behandlung Antikörper für das Endotoxin erzeugt und daß die Resultate ermutigend waren. Nach 12 Einspritzungen des Typhuszellsaftes war $^1/_{50}$ ccm des Ziegenserums im stande, 10 tödliche Giftdosen zu neutralisieren. Diese Fähigkeit war nicht in 3 ccm Normalserum vorhanden. Es war deshalb gelungen, nicht nur eine antiendotoxische Wirkung zu konstatieren, sondern den Wert des Serums bedeutend zu erhöhen. Es war eine bemerkbare Steigerung des Immunisierungswertes des Serums erzielt.

In dieser Mitteilung beabsichtige ich nicht auf die agglutinierenden und bakteriolytischen Eigenschaften des Serums einzugehen. Agglutinine waren in schwankender Menge vorhanden. — Der höchste Titer war bei $^1/_{1\,000\,000}$ Verdünnung des Serums erreicht. Was Bakteriolysine betrifft, schützte nach 12 Einspritzungen des Zellsaftes $^1/_{10\,000}$ ccm des Serums Meerschweinchen intraperitonal gegen 10 tödliche Dosen der Typhusbacillen.

Das Serum der Ziege I besaß also bestimmte antiendotoxische, agglutinierende und bakteriolytische Eigenschaften. Hiernach habe ich an frischen Ziegen diese Resultate kontrolliert und die Behandlung noch vorsichtiger ausgeführt.

Die adoptierte Methode wird durch folgende Tabelle klar.

Ziege II.

Bekam intravenös jeden siebenten Tag folgende Mengen des toxischen Zellsaftes des B. typhosus:

$^1/_{20}$ ccm: Tier krank, $^1/_{20}$ ccm: wohl, $^1/_{15}$ ccm: krank, $^1/_{15}$ ccm: wohl, $^1/_{10}$ ccm: wohl, $^1/_{10}$ ccm: krank, $^1/_{10}$ ccm: krank, $^1/_{10}$ ccm: wohl, $^1/_8$ ccm: krank, $^1/_8$ ccm: wohl, $^1/_8$ ccm: wohl, $^1/_6$ ccm: krank, $^1/_3$ ccm: wohl, $^1/_6$ ccm: wohl. $^1/_4$ ccm: wohl, $^1/_4$ ccm: wohl, $^1/_3$ ccm: krank, $^1/_3$ ccm: wohl.

Drei Ziegen sind in Behandlung bei dieser Methode von geringer und sanfter Dosierung, und keine ist bis jetzt gestorben.

Das Serum der Ziege II war gleichfalls auf antiendotoxische Wirkung probiert. Die Resultate sind aus Tabelle III ersichtlich. Während die Menge des Zellsaftes in Ziege I injiziert von $^1/_{20}$ bis $2^1/_2$ ccm erhöht wurde, betrug die Menge am Ende der jetzigen Proben in Ziege II injiziert nur $^1/_3$ ccm Zellsäfte, 10—12 mg feste Substanz enthaltend.

III.
Serumprüfung der Ziege II.

Datum	Kaninchen	Serum + Endotoxin	Bemerkungen
29. Dez. 1905	1	$^1/_{50}$ ccm Serum + 1 ccm Endotoxin	lebt
	2	$^1/_{20}$ " " + 1 " "	tot
	3	$^1/_{100}$ " " + 1 " "	lebt
	4	Kontrolle $^1/_5$ " "	tot nach 2 Std.
	5	" $^1/_{10}$ " "	akut Diarrhöe
19. Jan. 1906	1	$^1/_{50}$ ccm Serum + 1 " "	lebt
	2	$^1/_{100}$ " " + 1 " "	tot
	3	Kontrolle $^1/_{10}$ " "	"
26. Jan. 1906	1	$^1/_{50}$ ccm Serum + 1 " "	lebt
	2	$^1/_{100}$ " " + 1 " "	tot
	3	Kontrolle $^1/_{10}$ " "	"
2. Febr. 1906	1	$^1/_{10}$ ccm Serum + 1 " "	lebt
	2	$^1/_{20}$ " " + 1 " "	"
	3	$^1/_{50}$ " " + 1 " "	"
	4	$^1/_{50}$ " " + $^1/_2$ " "	"
	5	Kontrolle $^1/_{10}$ " "	tot nach $2^1/_2$ Std.
	6	" $^1/_{20}$ " "	" " 2 "
	7	" $^1/_{30}$ " "	" " 18 "
9. Febr. 1906	1	$^1/_{50}$ ccm Serum + 1 " "	lebt
	2	$^1/_{50}$ " " + 1 " "	"
	3	$^1/_{100}$ " " + 1 " "	tot
	4	$^1/_{100}$ " " + $^1/_2$ " "	lebt
	5	Kontrolle $^1/_{10}$ " "	tot
	6	" $^1/_{20}$ " "	akut Diarrhöe.

Die Tabelle demonstriert nochmals das Erzeugen in deutlicher Menge eines Antiendotoxins. Der antiendotoxische Wert war so weit erhöht, daß schon $^1/_{50}$ ccm Serum der Ziege II genügte, um ein Kaninchen gegen 30 tödliche Dosen des Giftes zu schützen.

Trotz Injizieren relativ kleinerer Mengen des Zellsaftes als in Ziege I waren die Resultate, was antiendotoxische Wirkung betrifft, äquivalent, und eine deutliche Steigerung der Immunität nachweisbar. Diese Steigerung hervorzubringen, war das schwierigste Problem, das ich zu lösen hatte und es ist mir so weit gelungen.

In folgenden Versuchen wurden Serum und Gift simultan, aber getrennt injiziert.

Kaninchen I: Erhielt 15 tödliche Dosen Typhuszellsaft in die rechte und 1 ccm Serum in die linke Ohrvene. 20 Minuten später wurde noch 1 ccm Serum injiziert. Das Tier lebte.

Kaninchen II: 5 tödliche Dosen Endotoxin in die rechte und 1 ccm Serum in die linke Ohrvene. Das Tier lebte.

Kaninchen III: 5 tödliche Dosen in die Ohrvene und $^3/_4$ Stunde später am Anfang der toxischen Symptome 2 ccm Serum. Das Tier lebte.

Dit antiendotoxische Wirkung war also auch unter diesen Bedingungen gelungen.

Das Agglutinintitrat des Serums war im Laufe der Immunisierung auch schwankend. Der höchste Titer war bei $^1/_{1\,000\,000}$ Serumverdünnung nachweisbar.

$^1/_{10\,000}$ ccm des Serums schützte Meerschweinchen gegen 10 tödliche Dosen Typhusbacillen.

Das Serum war auch gegen das Choleraendotoxin in folgender Weise probiert: $^1/_2$ ccm Typhusserum wurde mit drei tödlichen Dosen Choleraendotoxin gemischt und nach $^1/_2$ Stunde bei 37° C dem Kaninchen intravenös injiziert. Das Kaninchen starb $2^1/_2$ Stunde nach der Injektion. Dadurch war bewiesen, das $^1/_2$ ccm von Typhusserum, wovon $^1/_{50}$ ccm gegen 30 Dosen des Typhusendotoxins schützte, nicht fähig war gegen drei tödliche Dosen Choleraendotoxin zu schützen. Insoweit war das Serum spezifisch.

Das Serum der Ziege II wurde für Präzipitinreaktionen gegen den frischen Typhuszellsaft geprüft. Das Resultat war negativ in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:500. — Es waren keine bemerkbaren Präzipitine im Blut vorhanden, trotz der deutlichen antitoxischen Wirkung des Serums.

Schlußfolgerungen.

1) Durch intravenöse Behandlung der Ziege mit toxischen Zellsäften der Typhusbacillen (in der beschriebenen Weise gewonnen) in kleinen und sehr vorsichtig regulierten Mengen, ist es möglich geworden, ein Antiendotoxin zu gewinnen.

2) In dieser Weise ist es auch möglich geworden, eine prägnante Steigerung des antitoxischen Wertes des Serums zu erzielen — indem $^1/_{50}$ ccm 30 tödliche Dosen des toxischen Zellsaftes neutralisierte — eine Eigenschaft, die nicht in 3 ccm normalem Ziegenserum vorhanden ist.

3) Nach weniger als 4 Monate langer Behandlung der Ziege wurden diese Resultate schon erzielt. Sie sind nach einer rascheren Immunisierungsmethode unweit besser als die von Besredka mit toten und lebenden Bacillen erhaltenen, nach 2 Jahre langer Behandlung eines Pferdes.

4) Wirksam war auch das Serum gegen das Endotoxin, als beide simultan aber getrennt injiziert waren.

5) Das Serum wirkte agglutinierend auf Typhusbacillen in einer Verdünnung von $^1/_{1\,000\,000}$ ccm.

6) Das Serum war auch bakteriolytisch, $^1/_{10\,000}$ ccm schützte gegen 10 tödliche Dosen des Typhusbacillus.

7) Das Serum hatte keine nachweisbare Präzipitinwirkung auf frische und toxische Typhuszellsäfte.

8) Das Typhusserum schützte nicht gegen drei tödliche Dosen des Choleraendotoxins und war in dem Maße spezifisch.

Es soll nun meine nächste Aufgabe sein zu versuchen, inwieweit es möglich ist, analoge Resultate beim Pferde zu erzielen.

Ich habe auch positive Resultate mit Choleraendotoxin an der Ziege erhalten, und werde bald ausführlich darüber berichten.

Ich bin Herrn E. T. Thompson für seine große Hilfe sehr verpflichtet, ebenso für eine Verbesserung am Apparat, wodurch der Zerkleinerungsprozeß ganz ungefährlich geworden ist.

Referate.

1) Macfadyen, Allan, Upon the immunising effects of the intracellular contents of the typhoid bacillus as obtained by the disintegration of the organism at the temperature of liquid air. (Proceedings, Royal Society. 12 March. 1903.). — Macfadyens, Allan and Rowland, Sydney, Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXX. 1901. No. 20 und Bd. XXXIV. 1903. No. 7.)

2) Besredka, Etude sur le bacille typhique et le bacille de la peste. (Annales de l'Institut Pasteur. T. XIX. 1905. Juillet.) — De l'antiendotoxine typhique et des antiendotoxines en général. (Ibid. T. XX. 1906. Février.)

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.